

食源性病原菌分型方法研究进展

陈颖*, 王婷, 杨海荣, 胡玥, 赵勇胜, 赵贵明

(中国检验检疫科学研究院农产品安全研究中心, 北京 100123)

摘要: 目前食源性病原菌常用的分型方法主要包括血清学分型、脉冲场凝胶电泳分型、多位点序列分型、多位点可变数目串联重复序列分型等, 在食源性病原菌的监测、传染源的追踪、流行病监测等方面具有重要意义。本文就食源性病原菌常用的分型方法及其应用情况进行综述。

关键词: 食源性病原菌; 分子分型; 应用

Progress on subtyping methods of foodborne pathogen

CHEN Ying*, WANG Ping, YANG Hai-Rong, HU Yue, ZHAO Yong-Sheng, ZHAO Gui-Ming

(Agro-product Safety Research Center, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

ABSTRACT: At present, serotyping, pulsed-field gel electrophoresis, multilocus sequence typing, multiple locus variable numbers of tandem repeats analysis are commonly used subtyping methods in foodborne pathogen, these methods are playing an important role in foodborne pathogen monitoring, tracking source of infection, and epidemiological surveillance, etc. This paper summarized typing methods and their application in foodborne pathogen.

KEY WORDS: foodborne pathogen; molecular subtyping; application

1 引言

食源性病原菌是导致食品污染的主要原因之一。近年来, 国内外由食源性病原菌导致的疾病事件时有发生。如 2005 年中国的猪链球菌暴发^[1], 2006 年美国因食用被大肠埃希菌 O157 污染的菠菜而导致的溶血性尿毒综合症的暴发^[2], 2011 年 5 月至 7 月, 德国暴发由 O104 导致的溶血性尿毒综合症^[3], 2011 年 8 月至 10 月, 美国多个州因食用科罗拉州的新鲜哈密瓜而导致的李斯特菌的暴发^[4]等。对食源性疾病的预防控制已经成为各国关注的焦点^[5], 其中, 食源性病原菌的检测和溯源技术是预防控制食源性疾病的关键环节。本文就目前国内外常用的食源性病原菌的分型溯源方法综述如下。

2 病原菌的分型方法

一种方法能否用于病原菌的分子分型大致需要从以下几个方面考虑: 分型力、重复性、鉴别能力、结果易于解释、快速、经济、技术简单等^[6]。病原菌的分子分型方法可以分成两大类: 表型分型方法和基因分型方法; 表型分型方法包括血清学分型、抗生素敏感性分型、噬菌体分型等, 基因分型方法包括质粒图谱分型、核糖体分型、脉冲场凝胶电泳、以 PCR 为基础的分型方法等。

2.1 表型分型

传统的病原菌分型主要根据菌株的表型特征、生理生化等特点进行分型。病原菌能观察到的表型特征有限, 因此传统分型不能提供菌株间足够的信息, 在

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAK17B10、2012BAD29B02); 质检公益项目(201210043)

*通讯作者: 陈颖, 女, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品的质量与安全。E-mail: yqychen@yahoo.com.cn

实际应用中具有一定的局限性。

2.1.1 血清学分型

根据病原菌菌体抗原、外膜抗原、鞭毛抗原等的不同,用特异性的抗血清进行凝集反应,区分不同的分离株。简便快速,在医院感染监测中确定感染菌株的流行和微生物特征,具有重要意义,缺点是分型率不高,有时不易获得相关分型血清,有时某些菌株用现有分型血清不能进行分型鉴别^[7]。

2.1.2 抗生素敏感性分型

抗生素敏感性检测是临床微生物实验室常规应用的方法,手工操作和机器进行自动检测均可,可以进行严格的质量控制,操作简便,相对经济。如果进行详尽的流行病学分析时,抗生素敏感性分析用途有限,一方面现代医院中存在非常大的抗生素选择性压力,通过多种遗传机制一个特定的菌株可能会“突然”产生抗性,另一方面,如果没有特定的选择压力,与耐药相关的遗传元件很可能丢失^[8]。不同的菌株可能会有相同的抗性图谱,在患者不同时期分离到的同一种菌株,可能会有不同的抗生素敏感性图谱^[9]。这些在一定程度上限制了该方法的应用。

2.1.3 噬菌体分型

噬菌体裂解细菌细胞具有一定的宿主特异性,根据该特性,可以筛选一组噬菌体用于病原菌的分型与传染源的追溯。但在实际应用中,除了参比实验室之外,很少有实验室能够拥有种类完全的噬菌体,此外噬菌体分型需要经验丰富的工作人员且噬菌体分型常会出现多样性的结果,对判读造成一定影响^[10-11]。

2.2 基因分型

随着分子生物学和基因组学的发展,各种分子分型技术广泛应用于病原菌的基因分型研究,使得快速、准确鉴别病原菌成为可能。

2.2.1 质粒图谱分型

病原菌携带的质粒在一定的时间和空间内是相对稳定且具有特征性,将病原菌的质粒,用琼脂糖凝胶电泳进行分离,通过测定质粒的数目和大小来进行流行病学分析,该方法简便快速,在早期的流行病学调查中被誉为快速分型方法。随后,研究者们将质粒用限制性内切酶消化,然后再进行电泳分析,使得质粒分型的重复性和分辨力大大提高。Wells 等用质粒分型的方法对美国 1982 年由 O157:H7 引发的两起出血性肠炎进行了分析,发现两次暴发分离菌株

的质粒特征是相同的,并且与污染食品中分离的菌株质粒图谱相同^[12]。然而,病原菌可以自发丢失质粒和获得质粒,质粒还可以在不同菌株之间结合转移,这就使得质粒分析的结果有时难以解释。

2.2.2 核糖体分型

核糖体分型是一种特殊的 Southern blot 分析方法,用核糖体操纵单元相关 RFLP 对菌株进行分析。国际上已经有完全自动化的机器,如美国杜邦公司的 RiboPrint 微生物分型系统,操作简便快速,自动化程度高,排除了人为因素的影响,重复性好结果稳定^[13]。在一般情况下,来源于同一暴发相关的菌株具有相同的核糖体型,但该方法对基因组中微小差异区分有限,流行病学上无关的菌株经常会有相同的图谱^[14],这就直接限制了该方法的应用。

2.2.3 脉冲场凝胶电泳(PFGE)

脉冲场凝胶电泳分辨率高、重复性好、结果稳定易于标准化被认为是病原菌分型的“金标准”。它的基本原理是在凝胶上加正交的交变脉冲电场,通过电场的不断改变,使包埋在凝胶中的 DNA 分子泳动方向发生相应的改变,每当电场方向改变后, DNA 分子便滞留在凝胶中直至沿新的电场轴向重新定向后,才能继续向前移动。DNA 分子越大,这种重排所需要的时间就越长。如果 DNA 分子变换方向的时间小于电脉冲周期, DNA 分子按其大小被区分开,最终达到分型的目的。PFGE 是一种有效的分型方法,广泛应用与多个菌种的分子分型与溯源及耐药性监测。秦天等对 117 株 10 个不同血清型的嗜肺军团菌和 17 种非嗜肺军团菌进行 PFGE 分型,结果表明 PFGE 可以成功用于嗜肺军团菌的流行病学调查^[15]。章红红等运用脉冲场凝胶电泳对腹泻门诊病人的副溶血弧菌分离株进行分子分型,对缺乏聚集性信息的病例展开实验室检测^[16]。应用 PFGE 分子分型,通过实验室监测可提示可能出现聚集性病例或暴发,结合流行病学调查资料可以分析和确诊聚集性病例事件发生。杨劲松等对福建省鼠伤寒沙门菌 PFGE 分子分型和耐药的关联性进行研究,表明 P1 型与多重耐药严重的菌株存在关联性^[17]。

PFGE 是目前最受推崇的分型方法,但是 PFGE 操作复杂,花费较高且电泳结果易受人为等因素的影响^[18]。

2.2.4 多位点序列分型(MLST)

多位点序列分型是以核苷酸序列测定为基础的

基因分型方法。通过对多个管家基因内 500 bp 左右的核苷酸片段进行测序分析, 序列之间的差异反应菌株之间亲缘关系。所得数据可以通过网络实现不同实验室之间的比较与数据共享^[19]。近年来, 广泛应用于病原菌的分型、群体遗传学与进化研究。Wang 等对我国 1999–2000 年苏皖地区 O157 暴发相关菌株进行多位点序列分型, 表明暴发相关菌株是一个新的序列型 ST96, 该型别菌株包含一个 38kb 的结合转移质粒, 可能与暴发相关^[20]。周晓艳等对病人体内分离的羊种布鲁氏菌进行多位点序列分型, 了解菌株的遗传特征及进化关系。结果表明, 我国流行的羊种布鲁氏菌主要是羊 3 型菌株, 国内菌株与国外菌株遗传背景不同^[21]。赵帆等对国内分离的 80 株汉赛巴尔通体进行多位点序列分型, 分析其分子流行病学特征及系统发育情况。研究结果表明 80 株汉赛巴尔通体可分为 3 个序列型, 均属于克隆群 1, 提示中国的汉赛巴尔通体变异度和多样性较低进化相对缓慢^[22]。

MLST 方法也有一定的局限性, 管家基因的变异程度决定该方法的分型力。测序成本的高低也在一定程度上限制了该方法的应用。

2.2.5 多位点可变数目串联重复序列分型(MLVA)

多位点可变数目串联重复序列分型的基本原理是病原菌基因组 DNA 中存在数目可变的串联重复位点, 这些位点的碱基序列和数目相对恒定, 在病原菌分离株中表现出株或种水平的特异性, 对多个位点进行检测, 可以将不同菌株分为不同的基因型。该方法简便快速, 对 DNA 质量要求不高, 重复性稳定性好, 且提供的是数字化的信息便于在不同实验室之间进行数据共享与交换。同重湘等选择 15 个串联重复序列(VNTR)位点对 2005–2007 年甘肃省飞科医院临床分离的结核分枝杆菌进行 MLVA 分型研究, 表明在甘肃结核分枝杆菌中存在丰富的基因多态性, MLVA 方法具有较高的基因分型能力, 可以满足结核分枝杆菌菌株水平 DNA 分型的需要^[23]。

串联重复序列是病原菌基因组中进化速率较快的区域, 重复区域内的变异是导致 DNA 序列进化的因素之一^[24–25]。进化速率较快的串联重复序列可能会导致同一暴发菌株出现不同的 MLVA 型别^[26]。

2.2.6 其他 PCR 分型方法

扩增片段长度多态性(AFLP), Rep-PCR, 随机引物扩增片段(RAPD)等方法都在食源性致病菌分子分型方面发挥了作用。虽各有长处但同时存在一定的

局限性, 如重复性差, 结果难以解析, 费用高等, 未能广泛应用于食源性致病菌的分型研究^[27–28]。

3 小结

综上所述, 运用分子生物学方法对食源性病原菌进行分型, 不同的方法各有优缺点, 任何一种单一的方法所得出的结论都具有片面性。目前, 寻找具有足够分辨力的单一技术区分食源性病原菌是一项技术难题。现阶段较为理想的分型策略是根据自身的特点和检测目的进行多种方法的联合应用, 其中以 PFGE 和其他的方法联合效果最佳、应用较多^[29–30]。随着分子生物学技术的发展, 作为一种非常有价值的技术手段, 分子分型技术将在食源性病原微生物分型中具有更加广泛的推广和使用。

参考文献

- [1] Ye CY, Zhu XP, Jing HQ, *et al.* Streptococcus suis sequence type 7 outbreak, Sichuan, China [J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(8): 1203–1208.
- [2] Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, *et al.* Variation in virulence among clades of Escherichia coli O157 : H7 associated with disease outbreaks [J]. PNAS USA, 2008, 105(12): 4868–4873.
- [3] Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, *et al.* Origins of the E. coli strain causing an outbreak of hemolytic uremic syndrome in Germany [J]. N Eng J Med, 2011, 365(8): 709–717.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen farms [Outbreaks highlights] [2011-12-09]. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>.
- [5] Lynch MF, Tauxe RV and Hedberg CW. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities [J]. Epidemiol Infect, 2009, 137, 307–315.
- [6] 王丽丽, 徐建国. 脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)在分子分型中的应用现状[J]. 疾病监测, 2006, 21(5): 276–279.
- [7] Ye CY, Lan R, Xia SL, *et al.* Emergence of a new multidrug-resistant serotype X variant in an epidemic clone of shigella flexneri [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 419–426.
- [8] 肖瑶. 细菌耐药机制研究进展[J]. 北京医学, 2011, 33(3): 228–230.
- [9] 叶青, 程永樟, 陈学军, 等. 儿童细菌性肺炎常见病原菌分布及耐药性分析[J]. 浙江检验医学, 2008, 6(3): 38–39.
- [10] 林一曼, 兰全学, 石晓路, 等. 噬菌体分型技术和脉冲场凝胶电泳技术对肠炎沙门菌分型的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(5): 998–999.
- [11] 霍开兰, 陈道利, 刘燕. 136 株金黄色葡萄球菌产毒及噬菌体分型的研究[J]. 安徽预防医学杂志, 2006, 12(4): 240–241.

- [12] Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, *et al.* Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype [J]. *J Clin Microbiol*, 1983, 18(3): 512-520.
- [13] 裴晓燕, 郭云昌, 刘秀梅. 阪崎肠杆菌自动化核糖体分型研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2009, 43(10): 900-902.
- [14] 周海建, 张力, 韩辉, 等. 脉冲场凝胶电泳和自动化核糖体分型方法用于霍乱弧菌分子分型能力的比较[J]. *疾病监测*, 2011, 26(4): 325-327.
- [15] 秦天, 任红宇, 周海建, 等. 脉冲场凝胶电泳用于军团菌分型能力的评价[J]. *疾病监测*, 2011, 26(3): 182-186.
- [16] 章红红, 陈洪友, 陈敏, 等. PFGE 分子分型法在副溶血弧菌腹泻散发病人中的应用研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(5): 1042-1044.
- [17] 杨劲松, 陈建辉, 林杰, 等. 福建省鼠伤寒沙门菌 PFGE 分子分型和耐药的关联性研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(1): 10-13.
- [18] 丁水军. 脉冲场凝胶电泳技术及其在病原菌分子分型中的应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(4): 962-964.
- [19] 姬小微, 廖亚玲, 毛旭虎, 等. MLST 分析在病院微生物基因分型应用中的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(2): 246-249.
- [20] Wang P, Xiong YW, Lan R, *et al.* pO157_sal, a novel conjugative plasmid detected in outbreak isolates of *Escherichia coli* O157 : H7 [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(4): 1594-1597.
- [21] 周晓艳, 陈燕芬, 崔步云, 等. 我国羊种 3 型布鲁氏菌的多位点序列分型研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(5): 371-375.
- [22] 赵帆, 宋秀平, 栗冬梅, 等. 中国汉赛巴尔通体分离株的多位点序列分型分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(7): 592-596.
- [23] 同重湘, 赵秀芹, 马建军, 等. 甘肃省临床分离结核分枝杆菌 MLVA 分型初步研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(7): 627-630.
- [24] Van BA. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) [J]. *FEMS Immunol Medl Microbiol*, 2007, 49(1): 22-27.
- [25] 王涛, 慕廷娜, 刘凯, 等. 大肠埃希菌 O157 : H7 分离株 MLVA 分子分型[J]. *中国公共卫生*, 2011, 27(8): 972-974.
- [26] 裴迎新, 王晓平, 苏华, 等. 肠出血性大肠埃希菌遗传基因分型方法比较[J]. *中国公共卫生*, 2008, 24(5): 525-527.
- [27] 王庆忠, 姜峥, 宣瑛. 病原菌分子分型方法研究进展[J]. *检验医学*, 2009, 24(5): 397-400.
- [28] 陈琛, 李承毅. 肠道病原菌的分子分型研究方法进展[J]. *微生物免疫学进展*, 2010, 38(2): 57-61.
- [29] 张红宇, 王冰, 闫笑梅, 等. 应用 PFGE 及 SPA-typing 基因分型技术对金葡菌食物中毒溯源分析[J]. *职业与健康*, 2011, 27(7): 727-729.
- [30] 王冰, 扈庆华, 兰全学, 等. 单核细胞增生李斯特菌 PFGE 分型与血清学分型的联合分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(3): 459-461.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



陈颖, 女, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品的质量与安全。

E-mail: yqychen@yahoo.com.cn

“食品安全追溯信息系统”专题约稿函

“食品安全追溯信息系统”是指运用规模化养殖技术、计算机技术、自动识别技术等现代化技术, 来完成对食品从生产源头到销售终端安全控制与追溯体系的建立, 从而满足人们对安全食品的需求。《中华人民共和国食品安全法》明确了食品安全追溯的要点, 规定企业在食品生产环节、加工环节、流通环节都要有能够实现追溯所要记录的内容, 强化了“从农田到餐桌”的全程监管。“食品安全追溯信息系统”在 2008 年北京奥运会期间已成功应用。目前, 食品安全追溯系统正逐步走进普通市民的生活。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品安全追溯信息系统”专题, 围绕食品安全追溯信息系统的功能、构建、应用、管理等问题展开讨论, 计划在 2012 年下半年出版。编辑部特向各位专家诚征惠稿, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 10 月 15 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表专题论文。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: tougao@chinafoodj.com